Glutamat-Oxalazetat-Transaminase und Kreatinphospho-Kinase in präparativ elektrophoretisch aufgetrennten Herzextrakten

TATIANA S. ERDELY

1960

AUS DER MEDIZINISCHEN POLYKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

GLUTAMAT-OXALAZETAT-TRANSAMINASE UND KREATINPHOSPHO-KINASE IN PRÄPARATIV ELEKTROPHORETISCH AUFGETRENNTEN HERZEXTRAKTEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Tatiana S. Erdely

aus

New York / U.S.A.

München 1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Universität München

Referent:	Prof. Dr. H. Nowy
Korreferent:	Prof. Dr. W. Seitz
Dekan:	Prof. Dr. F. Marguth
Tag der mündlichen Prüfung:	12. 11. 1968

UNIV. LEIDEN BIBL.

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK · 8 München 13 · Telefon 597 397 [52 46 07]

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODE	5
1. Untersuchungsmaterial	5
2. Darstellung des Herzmuskelextraktes	5
3. Auftrennung mit Elphor V-Gerät ohne Kühlung	6
4. Auftrennung mit Elphor Va-Gerät	7
5. Auswertung der Pherogramme	9
6. Darstellung von GOT-Isoenzymen und CPK	9
EIGENE VERSUCHE	11
1. Elektrophorese der löslichen nicht kontraktilen Herzmuskelproteine	11
2. Analyse der einzelnen Pherogramme	12
a. Elektrophorese des Kalbsventrikels	13
b. Elektrophorese des Kalbsvorhofs	16
c. Elektrophorese des Kaninchenventrikels	18
d. Elektrophorese des Kaninchenvorhofs	20
3. Lokalisation von Enzymen im Kalbsventrikelpherogramm	22
4. Darstellung der Kreatin-Phosphokinase	25
DISKUSSION	27
1. Vergleich der Proteinfraktionen des Kaninchen- und des Kalbsmyocard	27
2. Diskussion über die Lokalisation der GOT-Isoenzyme	27

Seite

3. Diskussion über die Lokalisation der CPK-Isoenzyme 29

ZUSAMMENFASSUNG 31

LITERATURVERZEICHNIS 33

EINLEITUNG

In den letzten 70 Jahren sind durch die grundlegenden Arbeiten von WEBER (54, 55, 56), SZENT-GYORGYI (51), MOMMAERTS (41), DUBUISSON (11) und seiner Schule unsere Kenntnisse über die Feinstruktur der Muskelproteine sehr stark erweitert worden. Die spezifische muskuläre Eigenschaft der Kontraktilität ist als Polymerisation der beiden kristallinen Eiweißkörper F-Actin und L-Myosin zum fibrillären Protein Actomyosin unter Einwirkung von ATP geklärt worden. Neben der Entdeckung immer neuer Komponenten von kristallinen Proteinen wie Actomyosin, Tropomyosin, Paramyosin, Nukleomyosin, die wegen ihres großen Molekulargewichtes (400 000 - 800 000) in Wasser oder niedermolekularen Lösungen nicht löslich sind, wandte sich die Forschung auch dem Sarkoplasma zu. Das Sarkoplasma enthält Proteine von einem Molekulargewicht von etwa 80 000 - 100 000, die vorwiegend Enzymproteine sind. Schon 1895 isolierte FÜRTH (18) aus dieser wassernlöslichen Eiweißgruppe das Myogen. Besonders WEBER und BARANOWSKI (12) untersuchten das Myogen, das BARANOWSKI durch fraktionierte Aussalzung mit Ammoniumsulfat in hexagonalen Prismen kristallisieren konnte.

Die Anwendung der Elektrophorese als schonendste Trennungsmethode von Sarkoplasmaproteinen ermöglichte die Isolierung einer großen Zahl von Eiweißkörpern. In einer vergleichenden Untersuchung der Aussalzungsmethode und der elektrophoretischen Methode nach TISELIUS - LONGSWORTH gelang es DISTECHE (13) drei Eiweißfraktionen zu trennen. Neben dem Myogen, das sich in zwei Komponenten darstellen läßt, konnte das Myoalbumin, die gefärbte Fraktion des Myoglobulins und zwei weitere Fraktionen isoliert werden. Die löslichen Muskelproteine, die durch ihren isoelektrischen Punkt definiert sind, konnten wiederholt elektrophoretisch von DISTECHE (13), JAKOB (27) und HAAN (25) nachgewiesen werden. Eine Zusammenfassung und Analyse der Extraktionsmethoden und experimentellen Bedingungen der verschiedenen Autoren nahm HELANDER (25) vor. Er stellte für das gleiche Substrat, den gestreiften Skelettmuskel des Kaninchens, die optimalen Bedingungen für eine quantitative Proteinextraktion auf.

Den zahlreichen Arbeiten über die Elektrophorese des Skelettmuskels verschiedener Tiere und des Menschen, deren klinische Bedeutung durch die Biopsie und die Erforschung der progressiven Muskeldystrophien stark gewachsen ist, stehen jedoch nur wenige elektrophoretische Untersuchungen des Herzmuskels gegenüber. Parallel zur Bestimmung der Eiweißzusammensetzung des Skelettmuskels wurde von CRUCK (7) die Elektrophorese von Herzmuskelextrakten vorgenommen. Besonders NOWY (42) wandte sein Interesse der Erforschung der Proteinfraktionen des Myocards zu. Mit GUHL (23) trennte NOWY mit der Mikroelektrophorese nach ANTWEILER Extrakte aus normalem und hypertrophiertem Kaninchenmyocard in die drei Komponenten, das Myogen, das Myoglobulin und das Myoalbumin. Mit der verfeinerten Apparatur der horizontalen Membranelektrophorese erzielte NOWY (43) 1965 im Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, p_H 7,15, μ 0,04, mit den gleichen Ventrikelextrakten Pherogramme, in denen die drei großen Komponenten in sieben bis acht Fraktionen aufgetrennt sind.

Basierend auf den Arbeiten von NOWY (43) nahmen wir die Trennung der bei niederer Ionenstärke löslichen Proteine des Myocards des Kaninchen und des Kalbes mit der präparativen Elektrophorese nach GRASSMANN und HANNIG vor und untersuchten die Lokalisation der Enzymaktivität von Kreatin-Phospho-Kinase und Glutamat-Oxalat-Transaminase in diesen elektrophoretischen Komponenten.

Durch die Kristallisation eines Proteins mit Aldolaseaktivität aus der Fraktion I des Myogens A eines Kaninchenskelettmuskelextraktes leitete DISTECHE (12) die Erforschung der verschiedenen Enzyme der Myogenfraktion ein. Diese Fraktion scheint die meisten Enzyme des Zitronensäurezyklus und der anaeroben Glykolyse zu enthalten, wie BÜCHER mit der Aufstellung seiner Enzymverteilungsmuster aus Insektenflugmuskeln beweisen konnte. Die intensive Erforschung der Enzyme in den Zellstrukturen, wie dem endoplasmatischen Reticulum und den Mitochondrien, stieß auf eine Mehrzahl von Enzymen, die eine gleiche enzymatische Reaktion katalysieren, jedoch eine unterschiedliche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufweisen. Diese Proteine wurden von MARKES und MOLLER (40) und von WIEME (57) als Isoenzyme oder Isozyme definiert. Dieses unterschied-

liche elektrophoretische Verhalten der Isoenzyme der Gewebe liegt an der unterschiedlichen Aminosäuresequenz des Apoenzyms, wie sie WIELAND (59) und seine Arbeitsgruppe für die fünf Isoenzyme der Lactat-Dehydrogenase nachweisen konnten.

In der vorliegenden Arbeit soll die Lokalisation der beiden Enzyme Glutamat-Oxalat-Transaminase und Kreatin-Phospho-Kinase in elektrophoretischen Fraktionen der Myocardproteine des Kalbsventrikel bestimmt werden. Wir benutzten dabei die klinische Methode der UV- und Farbtest-Enzymkombinationen der Firma Biochemica Boehringer, Mannheim. Wie andere Untersucher, ROMMEL und MANCUSA (47), FLEISCHER (17), DECKER (10), BORST (2), die Elektrophoresen von reinem Enzym aus verschiedenen Organen und von verschiedenen Tieren durchführten, fanden wir auch in den Pherogrammen unserer Kalbsherzextrakte mehrere Isoenzyme der Glutamat-Oxalazetat-Transaminase und der Kreatin-Phospho-Kinase.

MATERIAL UND METHODE

1. Untersuchungsmaterial

Für die vorliegende Untersuchung wurde frisches, blutfreies Kalbsherz verwendet. Das normal schlagende Herz wurde rasch mit etwa 10 Liter Tyrodelösung (25 - 30°C) vom bulbus aortae aus durchgespült und unmittelbar darauf in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dies verhinderte die Denaturierung der Muskelproteine und Enzyme.

2. Darstellung des Herzmuskelextraktes

100 g Ventrikel (von Kaninchen bzs. Kalb) werden mit doppeltem Volumen aqua bidest. 2 Min. bei 0°C (im Eisbad) hochtourig mit einem Mixer (Starmixerprinzip) homogenisiert. Zur Extraktion der wasserlöslichen Proteine beläßt man dieses Homogenat 24 Stunden im Kühlschrank. Anschließend zentrifugiert man 15 Min. bei 4°C und 2000 U/Min. und pipettiert den Überstand, der die löslichen Proteine enthält, ab. Um eine bessere Ausbeute zu erreichen, wird das Sediment nochmals mit gleichem Volumen aqua bidest. gewaschen. Die vereinten Überstände werden in der Ultrazentrifuge bei 50000 U/Min. und 0°C 60 Min. zentrifugiert. Es folgt die Bestimmung des Gesamteiweißes (Biuretmethode) im klaren, rotbraunen Extrakt.

Um den für die Auftrennung notwendigen Eiweißgehalt von 4 bis 6 g% zu erreichen, engt man den Extrakt mit einem Ultrafilter ⊕ bei 0°C ein. Man dialysiert den Extrakt 48 Stunden gegen Trispuffer ⊕⊕ von p_H 8,6 bei 0°C, zentrifugiert und be -

---

⊕ : LKB Protukter AB Stockholm 12 Sweeden

⊕⊕ : Zusammensetzung des Trispuffers:

Tris	48,3 g	Zitronensäure	10,7 g
Mortalität	0,4	Aqua bidest. ad	1000,0 g

stimmt erneut den Eiweißgehalt. Durch Verdünnen mit Trispuffer oder weiteres Einengen mit Sephadex wurde die gewünschte Eiweißkonzentration erreicht. Dieser Extrakt wird bis zur Elektrophorese eingefroren im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

3. Auftrennung mit Elphor V-Gerät ohne Kühlung

Zu Beginn dieser Arbeit stand uns das Elphor V-Gerät zur Verfügung. Es ist das ursprüngliche Modell einer vertikalen präparativen Elektrophoreseapparatur. Es wurde nach dem Entwurf von GRASSMANN und HANNIG (20) gebaut.

Die elektrophoretischen Auftrennungsbedingungen für das Elphor V-Gerät wurden für den oben angegebenen Tris-Citrat-Puffer (27) aufgestellt. Er ermöglicht höhere Spannungen, ohne daß Salz auskristallisieren, im Gegensatz zu dem Phosphatpuffer nach SÖRENSEN.

Die beste Auftrennung von Herzmuskelproteinen wurde mit dem Elphorgerät ohne Kühlung unter folgenden Bedingungen erzielt:

Tris-Citrat-Puffer p_H 8,6, 0,4 molar
Papier Schleicher und Schüll 2040 b
Spannung 500 V
12 mA 6,0 W
Laufzeit 20 Stunden, Trennweite 26 cm
Elektrophoretische Trennung in 7 Fraktionen
Material: Kalbsventrikelextrakt, Gesamteiweißgehalt 4,5 g%

Die Arbeitsbedingungen des Elphor V-Gerätes sind auf die Elphor Va-Apparatur nicht übertragbar.

4. Auftrennung mit Elphor Va-Gerät

Die vertikale präparative Elektrophorese mit dem Elphor Va-Gerät wird ebenso wie mit der einfachen Elphor-Apparatur auf einem Papierbogen durchgeführt. Mit Hilfe der Pumpen, die den Puffer von den Elektroden in die Wanne, aus der der Papierbogen hängt, befördern, und insbesondere durch die Wasserkühlung ist das Elphor Va-Gerät leichter zu handhaben und bietet konstantere Bedingungen als das Elphor-Gerät.

Die Kühlung des Elphor Va-Gerätes besteht aus einer Spiralenröhre, die in die Rückwand der Kammer eingebaut ist und von kaltem Leitungswasser durchströmt wird. Die Temperaturdifferenz beträgt ungefähr $5^{o}C$, was genügt, die Joule'sche Wärme von dem Papierbogen abzuleiten. Der Feuchtigkeitsverlust des Bogens durch Verdunstung ist minimal, da sich in der Kammer ein konstantes Temperaturgleichgewicht einstellt und die Kammer ein geschlossenes System bildet.

Was den Bau und die Arbeitsbedingungen anbelangt, so besteht zwischen dem Elphor Va-Gerät mit Wasserkühlung und dem von HANNIG (26) beschriebenen Elphor Va-Gerät mit Luftkühlung eine große Ähnlichkeit.

Nach der Füllung der Puffertröge kann der Papierbogen eingespannt werden. Die Elphor Va-Trennbögen mit Zacken wurden von der Firma Schleicher et Schüll, Dassel, Selecta Filterpapiere bezogen. Mit dem Tris-Puffer wurden zwei Papiersorten (2040 a und 2040 b) ausprobiert. Jedoch wurde meistens die Stärke 2040 a bevorzugt, da sie günstigere Spannungen und damit weitere Auftrennung ermöglicht.

Der Papierbogen wurde 4 cm vom oberen Rand geknickt, damit er in die Pufferwanne eingetaucht werden konnte. Der freihängende Bogen wurde mit dem entsprechenden Puffer gleichmäßig besprüht. Ein zu starkes Sprühen ist dabei zu vermeiden, da sonst nasse Stellen entstehen, die eine Verzerrung des Bogens und einen Spannungsausfall zur Folge haben.

Der feuchte Bogen wird seitlich eingeklemmt und dadurch horizontal gedehnt. Die Elektrodenrillen werden vorher mit nasser Membranfolie abgedichtet. Vertikal wird der Bogen durch das Einspannen der Zacken in die entsprechenden Trichtergefäße am Boden der Kammer gedehnt.

Nach dem Schließen der Kammer werden die Wasserkühlung und das Stromnetz mindestens 4 Stunden vor der Zuleitung des Extraktes an das Gerät angeschlossen, damit ein konstantes elektrisches Feld entsteht. In dem Papierbogen 2040 a benötigt der Pufferstrom 4 Stunden, um den Weg von der Wanne bis zu den Zacken zurückzulegen. Während dieser Vorlaufzeit sinkt die Spannung um 50 - 60 Volt, die Stromstärke dagegen bleibt unveränderlich.

Zusammengefaßt wurde die Elektrophorese der löslichen Herzmuskelproteine mit der Elphor Va-Apparatur unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tris-Citrat-Puffer p_H 8,6, 0,4 molar
Papier Schleicher und Schüll 2040 a
Nach 4 Stunden Vorlaufzeit stellte sich die
Spannung auf 470 V
9,4 W
20 mA
entsprechend 13 V/cm.
Elektrophoretische Trennung in 7 Fraktionen
Material: Kalbsventrikelextrakt, Gesamteiweißgehalt 4 - 5 g%
Auftragsmenge: 0,07 ml/h.

Es wurden Laufzeiten von 6 bis 48 Stunden eingehalten.

Obwohl der durch die Elektroden teilweise zersetzte Tris-Citrat-Puffer nach einer Laufzeit von 12 Stunden im Elektrodentrog trüb wurde, blieb die Spannung, nachdem sie sich nach der Vorlaufzeit stabilisiert hatte, konstant. Danach wurde ein Teil des ausgefallenen Puffers durch frischen ersetzt. Ein Leerlauf der Elektrodenpumpe darf jedoch nicht zugelassen werden, da sich die Spannung sprunghaft ändert, sobald die Elektroden nicht mehr umspült werden.

5. Auswertung der Pherogramme

Nach Abschluß des Versuches wurde der Papierbogen an den Rändern des Rahmens herausgeschnitten und zwecks Proteinfärbung 10 Minuten lang in ein Färbebad filtrierter Amidoschwarz-Lösung gelegt. Der Bogen wurde 4 bis 5 mal mit Elphor-Entfärber (100 ml Eisessig + 900 ml Methanol) gewaschen, um die Proteinfraktionen darzustellen.

Die prozentuale Auswertung der Pherogramme wurde mit dem Elphor-Integraphen der Firma Bender und Hobein durchgeführt. Aus dem gefärbten Bogen wurde dazu ein 4 cm breiter und 18 cm langer Streifen an der Stelle, an der die Trennung am besten gelungen war, herausgeschnitten. Dieser Streifen wurde während 24 Stunden in einem Elphor-Transpavac-Gerät mit einem Bromthalein-Paraffin-Gemisch transparent gemacht und anschließend ausgewertet.

6. Darstellung von GOT-Isoenzymen und CPK

Die Firma Biochemica Boehringer und Söhne, Mannheim entwickelte eine GOT- und eine CPK-Testkombination, die im klinischen Laboratorium routinemäßig zur Bestimmung der Enzymaktivitäten im Serum verwendet werden.

Wir bestimmten die Aktivität der Transaminase in den einzelnen Röhrchen der vertikalen präparativen Kalbsventrikelelektrophorese in 5 Versuchsserien mit Hilfe der Boehringer GOT-Farbtestkombination nach REITMAN und FRANKEL (44) und in 6 Versuchsserien mit Hilfe der GOT-UV-Testkombination nach KARMEN, WROBLEWSKI und LADUE (32). Die Vorschriften der enzymatischen Tests wurden genau eingehalten. An zwei unserer Versuchsreihen führte die Firma Boehringer und Söhne, Tutzing Parallelmessungen der GOT- und CPK-Aktivitäten durch.

Die enzymatischen Analysen wurden am Kalbsventrikelextrakt durchgeführt, der nach der früher beschriebenen Methode vorbereitet wurde. Lediglich die Erhöhung des Gesamteiweißgehaltes durch die Vakuumfiltration wurde unterlassen. Nach 48-stündiger Dialyse wurde dieser nicht eingeengte Extrakt mit einem Eiweißgehalt von z. B. 1,56 g% der Elektrophorese mit dem Elphor Va-Gerät unter den aufgeführten Bedingungen unterzogen. Die Laufzeit des Extraktes wurde auf 24 Stunden ausgedehnt, um in den einzelnen Röhrchen etwa 2 ml Fraktionssubstrat abfangen zu können. Geprüft wurden die GOT- und CPK-Aktivitäten, der Trennweite des elektrophoretischen Bildes entsprechend, in 30 Röhrchen.

Die Messungen erfolgten bei 340 mμ im Eppendorf-Photometer mit linearem Direktschreiber. Die Küvetten waren auf 25°C thermostatisiert. Die Werte der GOT- und CPK-Aktivitäten der einzelnen Röhrchen wurden auf eine Kurve in internationalen Millieinheiten pro ml Fraktionssubstrat (45) aufgetragen. Diese Enzymaktivitätskurve wurde, wie Abbildung 6 zeigt, über der Eiweißkonzentrationskurve der einzelnen Röhrchen gezeichnet. Diese Methode erlaubt, die Enzymfraktionen auf der Elektrophorese zu lokalisieren und sie in Beziehung zu den Proteinfraktionen zu bringen.

EIGENE VERSUCHE

1. Elektrophorese der löslichen nicht kontraktilen Herzmuskelproteine

Der große Vorteil des Elphor Va-Gerätes gegenüber der horizontalen Elektrophorese besteht in der präparativen Isolierung der einzelnen Fraktionen. Ohne die Pherogramme eluieren zu müssen, erhält man größere Volumina des getrennten Substrates. Leider konnte die Messung des Durchflußvolumens nicht vorgenommen werden. Jedoch wurde der Versuch unternommen, an Hand einer Bestimmung der Eiweißkonzentration der gesammelten Fraktionen die quantitative Reproduzierbarkeit der präparativen Auftrennung zu prüfen. Die Auftrennung erfolgte unter den angegebenen Bedingungen, wobei die Laufzeit des Extraktes 24 Stunden betrug.

Es wurde angestrebt, die Bedingungen so konstant wie möglich zu halten. Obwohl bei allen Pherogrammen eine Trennweite von 23 Zacken auftritt, ergaben sich örtliche Verschiebungen in der Lokalisation des Eiweißmaximums der einzelnen Fraktionen, die auf Schwankungen der Fraktionen um eine Zackenbreite zurückzuführen sind.

Der Eiweißgehalt der einzelnen Fraktionen wurde nach der Formel von WARBURG und CHRISTIAN (53):

$$E_{280} \cdot 1{,}55 - E_{260} \cdot 0{,}76 = (\text{mg/ml})$$

bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde in eine Kurve aufgetragen. Die Gipfel dieser Kurve decken sich genau mit den Maxima der Eiweißfraktionen auf den gefärbten Elektrophoresebildern. Das folgende Diagramm zeigt eine solche Eiweißkurve.

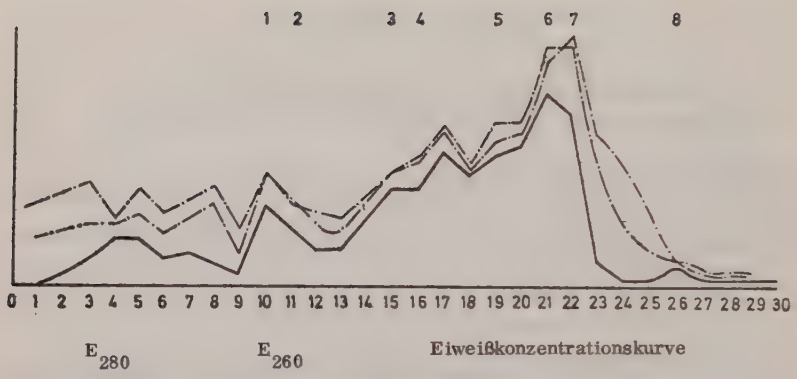


Abb. 1: Eiweißkonzentrationskurve bei Wellenlänge 260 und 280 mμ

2. Analyse der einzelnen Pherogramme

Als Vergleich zu Pherogrammen von Kaninchen- und Kalbsherzen können die membranelektrophoretischen Untersuchungen des Kaninchenmyocards von NOWY 1965 (43) und die Auftrennung des Kalbsmyocards von CRUCK 1953 (9) dienen. Die Vergleichbarkeit der getrennten Proteine unserer Pherogramme und derjenigen der beiden Autoren ist durch die niedrige Ionenstärke der Extraktion des gemeinsamen Substrates gewährleistet. Wie CRUCK bestätigen konnte, gehen die kontraktilen Proteine des Myosin, Gruppe II der Nomenklatur nach DUBUISSON, des Kalbsskelettmuskels nicht unter Ionenstärke von $\mu = 0,35$ und die des Kalbsmyocards sogar nicht unter $\mu = 0,50$ der Extraktionsflüssigkeit in Lösung. Die Löslichkeit des Kaninchenmyosins liegt nicht unter $\mu = 0,15$. Wäßrige Extrakte müssen analoge Proteine enthalten, wie die KCl-Extrakte, $\mu = 0,15$ von NOWY und die Phosphatpufferextrakte, $\mu = 0,15$ von CRUCK. In der Bezeichnung der Eiweißfraktionen unserer Pherogramme bedienen wir uns der Nomenklatur von NOWY (43), da die Nomenklatur von DUBUISSON und JACOB (27, 28), die CRUCK für das Kalbsherz benutzt, sich für die Fraktionen der Skelettmuskelelektrophorese eingebürgert hat. Obwohl Herzmuskel

und Skelettmuskel viele gemeinsame Eigenschaften haben, ist für die Herzmuskelfraktionen eine eigene Nomenklatur angebracht, um wiederholte Vergleiche mit den Skelettmuskelfraktionen zu vermeiden.

Es konnten mit der präparativen Elektrophorese 7 - 10 Proteinfraktionen im Kaninchenvorhof- und Ventrikelmyocard und Kalbsvorhof- und Ventrikelmuskel isoliert werden.

Ebenso wie bei CRUCK zeigt sich bei unseren Pherogrammen die Tendenz der Proteinfraktion, sich um drei Hauptkomplexe zu gruppieren: 1.) um das schnell anodisch wandernde Myoalbumin, Gruppe III, Fraktion h beim Skelettmuskel, Fraktion 1 in der Nomenklatur nach NOWY; 2.) um die Fraktion 4, die von CRUCK als Gruppe II bezeichnet wird; 3.) um die gefärbte Fraktion 6, die das Myoglobin enthält und mit I beim Skelettmuskel bezeichnet wird. Die Bezeichnung II für die mittleren Fraktionen kann zu Mißverständnissen führen, da man annehmen könnte, daß diese Fraktionen Myosin und Aktomyosin enthalten, welche, wie bereits erwähnt, in diesen wäßrigen Extrakten nicht enthalten sein können.

a. Elektrophorese des Kalbsventrikels, Abb. 2

Vom linken und rechten Ventrikel wurden nicht zwei getrennte Elektrophoresen vorgenommen, sondern man verwendete verschiedene Teile beider Ventrikel. Bei optimalen Bedingungen konnten im Kalbsventrikelpherogramm neun Fraktionen nachgewiesen werden. Diese optimalen Bedingungen sind:

Tris-Puffer p_H 8,6, 0,4 molar
Papier 2040 a
Spannung 450 V
18 mA
8,1 W

Der erste Komplex III enthält:
Zwei anodisch schnellwandernde Komponenten, die mit der vertikalen präparativen Elektrophorese mehr oder weniger stark in allen vier Extrakten nachgewiesen wer-

den konnten und das Myoalbumin, die Fraktion 1 der Nomenklatur nach NOWY. Zwischen Myoalbumin und Fraktion 6 liegen im Kalbsventrikelpherogramm vier Fraktionen. Diese lassen sich schwer differenzieren. In den Trennungen von Kalbsventrikelextrakten für die präparative Analyse der Fraktionen auf Enzyme ist es uns nicht gelungen, diese Gruppe in vier Fraktionen aufzuteilen (siehe Abb. 2).

Der Komplex I besteht in allen Fällen aus drei Fraktionen, die stark ausgeprägte Fraktion 6 führt immer den Farbstoff Myoglobin mit sich.
Unter den gewählten Bedingungen $p_H = 8,6$ können die Proteine nur anodisch wandern. Die Fraktion 6 wird aber nicht anodisch abgelenkt und läuft senkrecht vom Auftragspunkt des Extraktes in das Röhrchen 21.

Die Fraktionen 7 und 8, die kathodisch durch elektroosmotische Kräfte abgelenkt werden, folgen der gefärbten Fraktion 6. Da die Ermittlung der Eiweißgehaltskurve nach der oben angeführten Formel in den Röhrchen 23 und 24 negative Werte ergab, und vermuten ließ, daß in der Fraktion 7 lösliche Ribonucleinsäuren, die der Formel nicht entsprechen, enthalten sind, wurde das Absorptionsspektrum im UV-Bereich gemessen. Die photometrische Messung an der Kurve vom 21. 11. 65 ergab jedoch im Röhrchen 23 ein Absorptionsmaximum bei 226 mμ, im Röhrchen 24 ein Absorptionsmaximum bei 330 mμ.

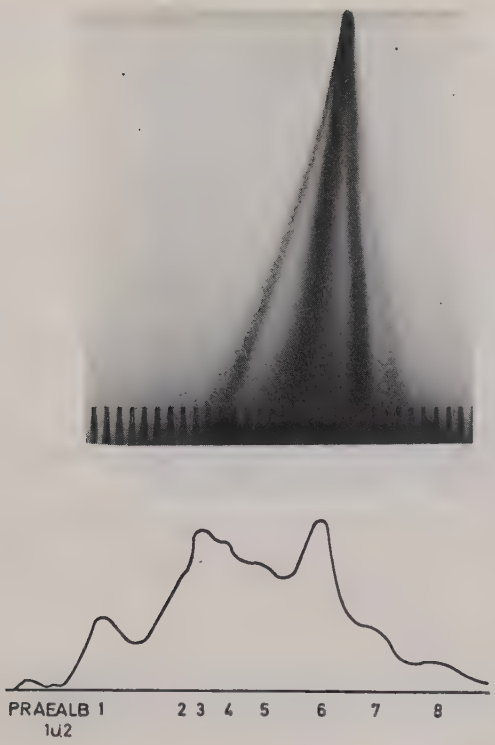


Abb. 2: Elektrophorese des Kalbsventrikels

Tris-Puffer p_H 8,6, 0,4 molar

Papier 2040 a

Spannung 450 V 8,1 W

18 mA

Laufzeit 8 Stunden, Trennweite 21 Zacken

8 Fraktionen

Eiweißgehalt 3,15 g%

b. Elektrophorese des Kalbsvorhofs, Abb. 3

Die Elektrophorese des Kalbsvorhofes wurde unter anderen Bedingungen durchgeführt als die der drei übrigen Muskelextrakte:

Tris-Puffer p_H 8,6, 0,4 molar
Papier 2040 b
Spannung 500 V
12 mA
6,0 W

In den drei großen Eiweißkomplexen des Kalbsvorhofpherogramms können wir folgende Fraktionen unterscheiden:
Die zur Anode schnellaufenden zwei Komponenten, die als Praealbuminfraktionen bezeichnet werden können und die Fraktion 1, das Myoalbumin;
die mittleren drei Eiweißfraktionen;
Fraktionen 2, 3 und 4, die zusammen verschmelzen und sehr schwach ausgeprägt sind;
die drei Fraktionen 6, 7 und 8. Die Fraktion, die auch im Kalbsvorhof gefärbt ist, läuft auch hier ohne abgelenkt zu werden senkrecht hinunter.

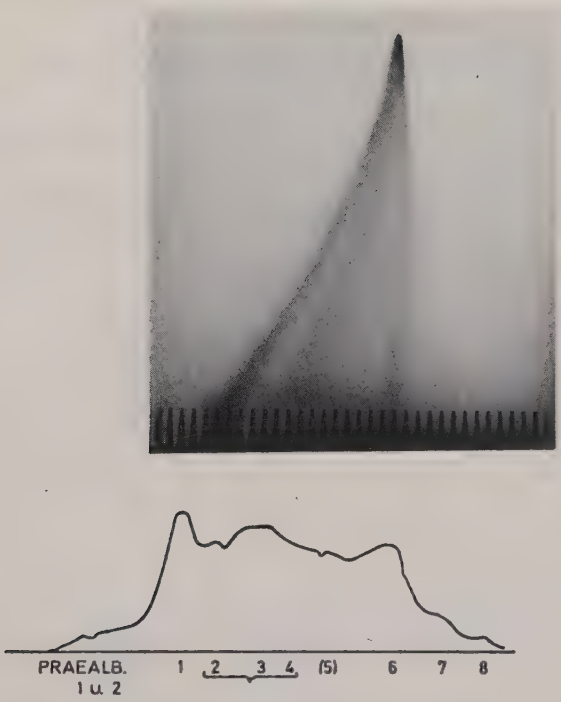


Abb. 3: Elektrophorese des Kalbsvorhofs
Tris-Puffer p_H 8,6, 0,4 molar
Papier 2040 b
Spannung 500 V
6,0 W
12 mA
Laufzeit 14 Stunden, Trennweite 23 Zacken
7 Fraktionen
Eiweißgehalt 3,87 g%

c. Elektrophorese des Kaninchenventrikels, Abb. 4

In den drei Eiweißkomplexen des Pherogramms des normalen Kaninchenventrikels lassen sich folgende Fraktionen unterscheiden:
Zwei Praealbuminfraktionen, Praealbumin 1 und 2, die scharf isolierte Fraktion 1, das Myoalbumin;
unter den obenangegebenen Bedingungen ist es nicht gelungen, die einzelnen mittleren Fraktionen eindeutig zu isolieren;
die Fraktionen 2, 3 und 4 bilden einen scharf gegen das Myoalbumin abgesetzten Streifen;
die stark in den Vordergrund tretende Fraktion 5;
drei Fraktionen 6, 7 und 8;
die gefärbte Fraktion 6 führt auch hier das Myoglobin mit sich.

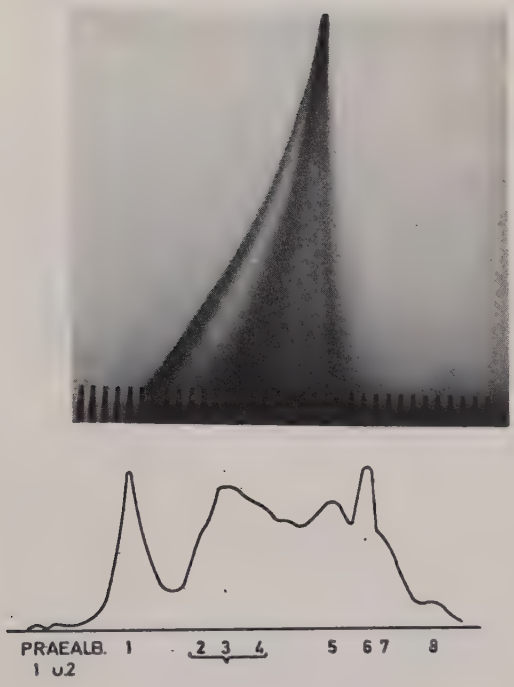


Abb. 4: Elektrophorese des Kaninchenventrikels

Tris-Puffer p_H 8,6, 0,4 molar

Papier 2040 a

Spannung 470 V

9,4 W

20 mA

Laufzeit 19 Stunden, Trennweite 24 Zacken

8 Fraktionen, einschließlich 2 Praealbuminfraktionen

Eiweißgehalt 3,15 g%

d. Elektrophorese des Kaninchenvorhofs, Abb. 5

Der Extrakt wurde aus fünf normalen Kaninchenvorhöfen gewonnen. Der Kaninchenvorhof wurde im Gegensatz zum Kalbsvorhof unter den Bedingungen der Standardmethode für das Elphor Va-Gerät getrennt.

Das Pherogramm zeigt zwei Praealbuminfraktionen und die starke Myoalbuminfraktion 1;
die mittleren Fraktionen lassen sich in die Fraktionen 2, 3 und 4 trennen, sie treten jedoch im gefärbten Bild nicht scharf genug in Erscheinung;
die Anwesenheit der Fraktion 5 kann überhaupt nicht nachgewiesen werden;
nach der gefärbten Fraktion zeigen sich, obgleich schwach ausgeprägt, die üblichen Fraktionen 7 und 8.

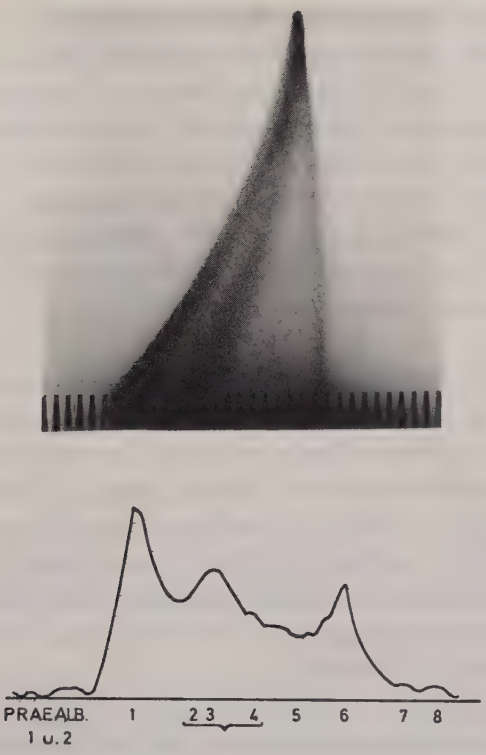


Abb. 5: Elektrophorese des Kaninchenvorhofs

Tris-Puffer p_H 8,6, 0,4 molar

Papier 2040 a

Spannung 480 V

9,6 W

20 mA

Laufzeit 12 Stunden, Trennweite 26 Zacken

7 Fraktionen, einschließlich 2 Praealbuminfraktionen

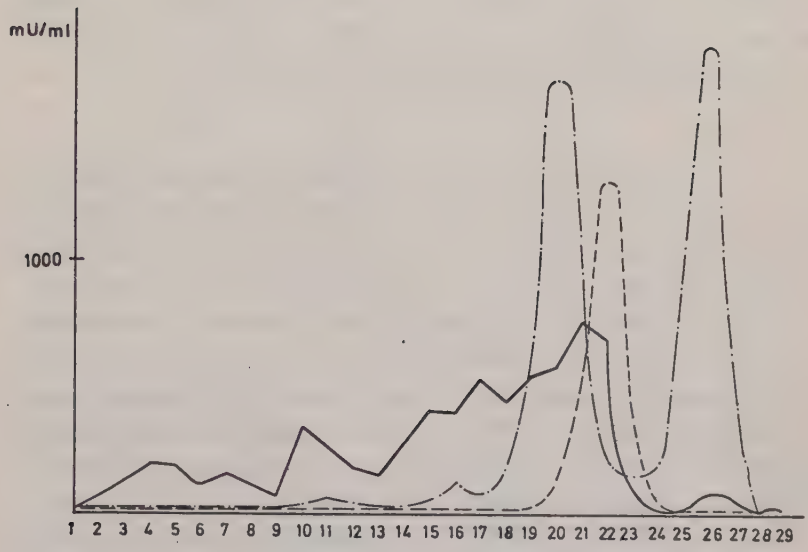
Eiweißgehalt 3,11 g%

3. Lokalisation von Enyzmen im Kalbsventrikelpherogramm

Unsere elektrophoretischen Trennungen dienten dazu, die Lokalisation von zwei Enzymen, der Glutamat-Oxalat-Transaminase und der Kreatin-Phospho-Kinase in den Fraktionen des Herzmuskelpherogramms nachzuweisen. Der Herzmuskel und das Leberparenchym enthalten besonders viel GOT. Der spezifische hohe Enzymgehalt dieser beiden Organe verursachte eine ganze Entwicklung von diagnostischen Untersuchungsmethoden, die Einblicke in den Stoffwechsel der Muskelzelle erlauben. Dem Zelluntergang in diesen Organen folgt eine Ausschwemmung der Enzyme in das Blut, und umgekehrt läßt jede Steigerung des Serumenzymspiegels auf eine Gewebsnekrose in diesen Organen schließen.

Ein hoher Anstieg der GOT-Aktivität konnte an zwei Stellen des Pherogramms festgestellt werden. Der empfindlichere GOT-UV-Test zeigt vor dem anodischen Isoenzym einen 500-fach geringeren Anstieg der Aktivität. Für die Bezeichnung der drei Isoenzyme übernehmen wir die Nomenklatur von BORST und PEETERS (2). Sie isolierten aus dem Herzmuskel des Rindes und des Schweines drei GOT-Isoenzyme. Ihre Methode (Chromatographie auf DEAE Cellulose) ist mit der vertikalen präparativen Elektrophorese nur annähernd vergleichbar, jedoch scheint die Identität der Eiweißzusammensetzung des Kalbsherzens und des Rinderherzens eine einheitliche Nomenklatur zu rechtfertigen.

In der Elektrophorese des Kalbsventrikelextrakts unter den Standardbedingungen ist das sehr schwache anodisch wandernde GOT-Isoenzym I im Röhrchen 1 lokalisiert. Das Maximum des zweiten anodischen Isoenzyms GOT II liegt im Röhrchen 20, zwischen der Eiweißfraktion 5, Röhrchen 19 und der Eiweißfraktion 6, Röhrchen 21. Das kathodisch durch elektroosmotische Kräfte abgelenkte Isoenzym GOT III breitet sich über mehrere Röhrchen aus und überlagert die Eiweißfraktion 8. Sein Maximum liegt im Röhrchen 26.



Lokalisation der Isoenzyme:	GOT	I	II	III	CPK	I	II
in Röhrchen Nr.:		16	20	26		11	22

Abb. 6: Enzymaktivität in den einzelnen Röhrchen der Kalbsventrikelelektrophorese

TABELLE 1

Experiment vom	Enzymaktivitäten in mμ / ml GOT 11.12.65	GOT 13.12.65	CPK 30.10.65	CPK 11.12.65	CPK 13.12.65
Röhrchen Nr.					
7	-	-	-	-	-
8	-	-	0,6	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	4,28	-	-
11	-	-	7,42	-	-
12	-	-	3,24	-	-
13	31,7	-	1,06	-	-
14	31,7	-	-	-	-
15	31,0	56,4	1,06	-	-
16	44,4	84,5	-	-	-
17	38,08	112,8	-	-	-
18	50,8	103,5	1,12	-	-
19	158,0	367,0	-	-	3,44
20	1050,0	1747,0	1,06	6,02	94,6
21	89,0	1222,0	1,3	8,6	670,0
22	38,08	252,0	583,0	516,0	1368,0
23	38,08	103,4	210,0	6,88	482,0
24	254,0	150,4	15,0	-	3,44
25	762,0	715,0	4,2	-	-
26	1263,0	1808,0	-	-	-
27	246,0	743,0	-	-	-
28	89,0	37,6	-	-	-
29	-	-	-	-	-

Lokalisation der CPK- und GOT-Aktivitäten:

GOT I in Röhrchen 16
II " " 20
III " " 26

CPK II in Röhrchen 22
I " " 11

4. Lokalisation der Kreatin-Phospho-Kinase im Pherogramm

Seit der ersten Reindarstellung der Kreatin-Phospho-Kinase von KUBY, NODA und LARDY (34) ist die Bedeutung dieses Enzyms für den Energiestoffwechsel des Muskels von vielen Autoren hervorgehoben worden. Eine umfangreiche und nach den Eigenschaften des Enzyms geordnete Literaturaufstellung ist bei KLEINE (33) zu finden.

Die Kreatin-Phospho-Kinase katalysiert die Gleichgewichtsreaktion:

Phospho-Kreatin + ADP Kreatin + ATP.

Die Bildung von energiereichem Phosphat über die Kreatin-Phospho-Kinase zusätzlich zur Glykolyse ist ein Reservemechanismus, auf den die Zelle nur bei starkem und kurzfristigem Energiebedarf zurückgreift (4, 6). Die höchsten Werte der CPK-Aktivität sind im Skelettmuskel, im Gehirn und im Herzmuskel anzutreffen. Der starke Anstieg der CPK-Aktivität im Serum von Herzinfarkt- und Muskeldystrophie-Patienten ist von besonderem klinischen Interesse. Der hohe Blutenzymspiegel ist für diese beiden Krankheiten ausgesprochen pathognomonisch und tritt beim Infarkt zeitlich vor allen anderen Enzymen, Transaminasen, vor Aldolase, Lactatdehydrogenase auf (DREYFUS und SCHAPIRO (15)).

In dieser Arbeit wurde die Lokalisation der Kreatin-Phospho-Kinase im Kalbsventrikelpherogramm untersucht. Für die Messung der CPK-Aktivität in den einzelnen Röhrchen der Elektrophorese mit dem Elphor Va-Gerät wurde die CPK-Testkombination von der Firma Boehringer und Söhne, Mannheim verwendet. Das untersuchte elektrophoretische Substrat ist das gleiche wie bei der Messung der GOT-Aktivität. In Abbildung 6 ist das Maximum der CPK-Aktivität in Bezug auf die Eiweißkonzentrationskurve aufgezeichnet.

Es wurde bei der CPK-Bestimmung an zwei Stellen des Pherogramms CPK-Aktivität festgestellt. Das Maximum der CPK-Fraktion befindet sich im Röhrchen 22. Die Fraktion liegt nach der Fraktion 6, eingeschoben zwischen den Fraktionen 6 und 7. Ein schwacher CPK-Aktivitätsanstieg konnte im Röhrchen 11 festgestellt

werden. Er würde im Bereich des Myoalbumins liegen. In weiteren Untersuchungen konnten von NOWY drei CPK-Isoenzyme im Pherogramm von Kalbsventrikelextrakten niederer Ionenstärke aber hoher Eiweißkonzentration nachgewiesen werden.

Anhand der Auftrennung mit der vertikalen präparativen Elektrophorese kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob die CPK-Fraktion mit der Fraktion 6 oder mit der Fraktion 7 läuft. Wir neigen dazu, diese CPK-Fraktion in die Fraktion 6 einzuordnen. Die Fraktion 6 ist keine einheitliche Proteinfraktion, außer ihrem gefärbten Anteil, der das Myoglobin enthalten soll, führt sie mehrere lösliche Muskelproteine, die unter den von uns gewählten Spannungsverhältnissen anscheinend nicht abgelenkt werden. In einigen Elektrophoresen, deren Trennweite und Spannung geringer waren, wurde ein Zusammenfallen des Maximum der CPK-Aktivität mit dem Maximum der Proteinkonzentration der Fraktion 6 im Röhrchen 21 beobachtet. Bei unseren Bedingungen jedoch wird die schmale CPK-Fraktion fast vollständig von Röhrchen 22 aufgefangen.

DISKUSSION

1. Vergleich der Proteinfraktionen des Kaninchen- und des Kalbsmyocard

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die präparative vertikale Elektrophorese der wasserlöslichen Myocardproteine von Kaninchen- und Kalbsvorhof und analog von Kaninchen- und Kalbsventrikel qualitativ sehr ähnliche Pherogramme ergibt. Das einzeige unterschiedliche Protein der beiden Ventrikel stellt die Fraktion 5 dar. Die Fraktion 5, die auch durch die horizontale Elektrophorese im Kaninchenventrikel nachgewiesen werden konnte, tritt im Kalbsventrikelpherogramm nicht abgetrennt und einzeln abgegrenzt in Erscheinung. Die Pherogramme von Kalbsventrikelextrakten $\mu = 0,15$ von CRUCK (8) zeigen auch keinen Anstieg der Kurve vor dem Komplex I, der unserer Fraktion 5 entsprechen würde. Es kann aber kein Zweifel an der Existenz der Fraktion 5 im Kalbsventrikel bestehen, da wir sie mit horizontaler Membranelektrophorese (Tris-Citrat-Puffer p_H 8,5, $\mu = 0,12$, Spannung 200 V, Gesamteiweiß 4,023 g%) scharf abgegrenzt von der gefärbten Fraktion 6 nachweisen können. Andererseits konnten NOWY und LEIDL (39) mit der präparativen Elektrophorese die Fraktion 5 im Kalbsventrikelextrakt gut isolieren. Unter ihren Versuchsbedingungen (EDTA-Tris-Puffer p_H 8,9, Spannung 480 - 500 V, 20 - 22 mA) stellte sich die Fraktion 5 durch ein Interval von der Fraktion 6 getrennt dar und lief konstant in das Röhrchen 18.
Als Bestätigung der Ergebnisse von CRUCK fanden wir, daß im Kalbsvorhof sowie im Kaninchenvorhof die Myoalbuminfraktion stark ausgeprägt ist und den Myoalbumingehalt des Ventrikels übertrifft.

2. Diskussion über die Lokalisation der GOT-Isoenzyme

Die meisten Autoren, die die Lokalisation von GOT-Isoenzymen analysierten, bedienten sich einer Methode, die mit unserer nur annähernd vergleichbar ist. Der Nachweis der GOT-Isoenzyme aus der Gewebstransaminase wird erbracht, indem

man auf die elektrophoretisch getrennte Transaminase Asparaginsäure und -Ketoglutarsäure aufträgt und bei 37°C inkubiert. Nach Ablaufen der Transaminierungsreaktion werden die GOT-Isoenzyme durch spezifische Färbung (6-benzamido-4-methoxy m toluidine-diazonium-chlorid) entwickelt. Mit dieser empfindlichen Methode konnte ROMEL und LaMANCUSA (47) zwei GOT-Isoenzyme im Serum eines Myocardinfarktpatienten nachweisen. Die anodische GOT-Fraktion lief zwischen $_2$ und -Globulin, die kathodische mit den -Globulinen. Die Zahl der Isoenzyme ist einerseits an die Spezies gebunden, andererseits scheint sie von der Empfindlichkeit der Nachweismethoden abhängig zu sein. Verschiedene Autoren haben am gleichen Tier eine verschiedene Anzahl von Isoenzymen festgestellt: FLEISCHER, POTTER und WAKIM (17) haben im Herzen des Menschen, Schweines und Hundes papierelektrophoretisch zwei GOT-Fraktionen isoliert, DECKER und RAU (10) agarelektrophoretisch zwei GOT-Fraktionen, ROMEL und LaMANCUSA (47) trennten aus dem Rinderherzen auf Azetatfolie zwei GOT-Fraktionen. Dagegen isolierten BORST (2) und PEETERS drei GOT-Isoenzyme aus dem Herzen des Rindes und des Schweines.

Unsere Trennungen des Gesamtextraktes mit der präparativen Papierelektrophorese und der anschließende selektive Nachweis der GOT-Isoenzyme mit den enzymatischen Tests scheinen uns am ehesten mit der Arbeitsmethoden von POTTER und WAKIM (17) vergleichbar zu sein. POTTER u. a. fanden zwei GOT-Fraktionen mit Hilfe der horizontalen Papierelektrophorese (Phosphatpuffer $p_H = 7,4$, $\mu = 0,075$).

BORST und PEETERS (2) konnten nachweisen, daß die kathodische GOT-Fraktion aus den Mitochondrien stammt und die anodische an das endoplasmatische Retikulum gebunden ist. Diese Herkunft können wir auch für unsere zwei GOT-Isoenzyme annehmen.

3. Diskussion über die Lokalisation der CPK-Isoenzyme

Untersuchungen von CPK-Isoenzymen sind erst in den letzten zwei Jahren ausgeführt worden. Die Ergebnisse dieser Beobachtungen weichen voneinander ab. Die Kreatin-Phospho-Kinase der Gewebshomogenisate von Mensch, Kaninchen und Ratte konnte in den meisten Organen in drei Isoenzyme getrennt werden.

KAR und PEERSON (30), die mit Hilfe der Agargelelektrophorese drei CPK-Isoenzyme aus Herz- und Skelettmuskel vom Menschen isolierten, bezeichnen das anodisch wandernde Isoenzym als Isoenzym CPK_3 und das dazwischen liegende als das Isoenzym CPK_2. Das Auftreten von drei CPK-Isoenzymen konnten auch EPPENBERGER, van FELLENBERG und RICHTERICH (16) in Rattenembryoskelettmuskulatur bestätigen. Im Gegensatz zur Isolierung von drei CPK-Isoenzymen in allen anderen Organen von Mensch und Kaninchen haben BURGER, RICHTERICH und AEBI (5) in späteren Untersuchungen mit der Agargelelektrophorese im Herz-Zwerchfellmuskel nur eine CPK-Fraktion nachgewiesen. Diese letzte Beobachtung widerspricht der Untersuchung von KAR und PEERSON. BURGER und Mitarbeiter isolierten im Herzextrakt sehr hoher CPK-Aktivität (20 IU) nur das leicht kathodisch abgelenkte Isoenzym CPK_{III}. Da in unserer vertikalen Kalbsventrikelelektrophorese die CPK-Fraktion auch leicht kathodisch durch Elektroosmose abgelenkt wird, ist es naheliegend, sie nach BURGER als CPK-Isoenzym III zu bezeichnen. Die von uns erreichte Isolierung einer einzigen CPK-Fraktion im Kalbsventrikelpherogramm bestätigt die Ergebnisse von BURGER.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit der präparativen Papierelektrophoreseapparatur Elphor Va nach GRASSMANN und HANIG wurden Pherogramme des wasserlöslichen Protein von Ventrikel und Vorhof von Kaninchen- und Kalbsherzmuskeln hergestellt.

2. Die Methode wurde standardisiert (p_H 8,6, $\mu = 0,08$) und die Eiweißfraktionen des Kalbs- und Kaninchenmyocard isoliert.

3. Die Lokalisation der Aktivität der Enzyme Kreatin-Phospho-Kinase und Glutamat-Oxalat-Transaminase in den Pherogrammen des Kalbsventrikels wurde bestimmt.

4. Die vertikale Elektrophorese des normalen Kaninchenventrikels ergibt acht Eiweißfraktionen. Sie konnte bereits an gleichen Extrakten mit der horizontalen Elektrophorese auf Azetatfolie nachgewiesen werden. Nach NOWY wurden die Fraktionen als 1, das Myoalbumin enthaltend, 2, 3, 4, 5, 6, das Myoglobin enthaltend, 7 und 8 bezeichnet.

5. Die vertikale Elektrophorese ließ noch vor der Myoalbuminfraktion 1 zwei zusätzliche Praealbuminfraktionen P_1 und P_2 zum Vorschein kommen.

6. Die Kaninchenvorhofelektrophorese zeigt nur sieben Fraktionen; die Fraktion 5, die vor der Myoglobinfraktion 1 läuft, konnte nicht festgestellt werden.

7. Pherogramme des Kalbsventrikels und des Kalbsvorhofs enthalten auch sieben Fraktionen.

8. Die Untersuchung der GOT-Aktivität in den präparativ-elektrophoretisch erhaltenen Eiweißfraktionen des Kalbsventrikel mit der Farb- und UV-Testkombination von Boehringer, Mannheim ergab GOT-Aktivitätsmaxima in den Röhrchen 16, 20 und 26. Dieser Aktivitätsanstieg entspricht den drei GOT-Isoenzy-

men, die im Herzmuskel auch anderer Tiere von verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert wurden.

9. Die CPK-Aktivität, mit der UV-Testkombination von Boehringer, Mannheim bestimmt, konnte im Röhrchen 22 nachgewiesen werden und wurde nach BURGER als CPK-Isoenzym III bezeichnet. Ein vielfach schwächerer Aktivitätsanstieg konnte im Röhrchen 11 nachgewiesen werden. Sie stellt sich im Bereich der Myoalbuminfraktion dar.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BARANY, M. et al.: Comparative studies of rabbit cardiac and skeletal myosins. Arch. Biochem. 106, 280 (1964)

2. BORST, P. und ENI M. PEETERS: The intracellular localisation of Glutamat-oxalacetate-transaminase in heart. Biochim. biophysica acta, N.Y. 54, 188 (1961)

3. BOYD, J.W.: GOT-Isoenzyme im Rattenserum. Clin. Chem. Acta 7, 424 (1962)

4. BURGER, A., M. EPPENBERGER, U. WIESMANN und R. RICHTERICH: Isoenzyme der Kreatinkinase. Helv. physiol. acta 21, 6 (1963)

5. BURGER, A., R. RICHTERICH und A. AEBI: Die Heterogenität der Kreatinkinase. Biochem. Zschr. 339, 305 (1964)

6. COLOMBO, J.P., R. RICHTERICH und E. ROSSI: Serum-Kreatin-Phsopho-Kinase. Bestimmung und diagnostische Bedeutung. Klin. Wschr. 40, 37 (1962)

7. CRUCK, S.: Contribution à la biochemie comparée des proteines musculaires dans les differants compartiments du coeur. Biochim. biophysica acta, N.Y. 10, 630 (1953)

8. CRUCK, S.: Contribution à l'étude des proteins du muscle cardiaque extractibles par des solutions salines. Arch. intern. de physiol. et de biochim. LXV, 1, 97 (1957)

9. CRUCK, S.: Contribution à l'étude des proteins du muscle cardiaque préalablement traité par les solvants organiques. Arch. intern. de physiol. et de biochim. LXV, 1, 117 (1957)

10. DECKER, L.E. und E.RAU: Multiples forms of GOT in tissues. Proc. Soc. exp. biol. med. 112, 144 (1963)

11. DISTECHE, A.: Etude des conditions de précipitation et de cristallisation de proteines musculaires du groupe du myogène. Biochim. biophys. acta 2, (1948)

12. DISTECHE, A.: A new crystalline proteine of the myogen group. Nature 164, 70 (1949)

13. DISTECHE, A.: Nouvelle contribution à l'étude des conditions de precipitation et de cristallisation des proteines musculaires du groupe du myogène. Biochim. biophys. acta 10, 524 (1953)

14. DITTMER, A.: Papierelektrophorese, Grundlagen, Methodik, klinische Betrachtung. Jena 1960

15. DREYFUS, J.G. und G.SCHAPIRA: Biochemie der progressiven Muskeldystrophie. Klin. Wschr. 40, 8, 373 (1962)

16. EPPENBERGER, H.M., R.van FELLENBERG, R.RICHTERICH und H.AEBI: Agargelelektrophorese der CPK in Rattenembryoskelettmuskulatur. Enzym. biol. clin. 2, 139, Basen 1962/63

17. FLEISCHER, G.A., C.S.POTTER und K.G.WAKIM: Separation of two glutamic-oxalacetic transaminases by paper electrophoresis. Proc. of Exp. Biol. 103, 229 (1960)

18. FÜRTH, O.v.: Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 36, 231 (1895)

19. GRASSMANN, W. und K.HANNIG: Ein einfaches Verfahren zur kontinuierlichen Trennung von Stoffgemischen auf Filterpapier durch Elektrophorese. Naturwiss. 37, 397 (1950)

20. GRASSMANN, W.: Neue Verfahren der Elektrophorese auf dem Eiweißgebiet. Naturwiss. 38, 200 (1951)

21. GRASSMANN, W. und K. HANNIG: Trennungen von Stoffgemischen auf Filterpapier durch Ablenkung im elektrischen Feld. Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 292, 132 (1953)

22. GRASSMANN, W. und K. HANNIG: Elektrophoretische Untersuchungen an Schlangen- und Insektentoxinen. Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 296, 30 (1954)

23. GUHL, H.: Elektrophoretische Untersuchungen am Kaninchenherzen. Diss. München 1961

24. HAAN, A. M. F. M.: Elektrophoretic study of easy soluble proteines of normal and atrofics rabbits muscles and of normal human muscles. Biochim. biophys. Acta 8, 346 (1952)

25. HAAN, A. M. F. H.: Elektrophoresis of the non-structural proteins from normal and atrophic muscles of rabbits and of man. Biochim. biophys. Acta 2, 258 (1953)

26. HANNIG, K.: Eine Apparatur zur kontinuierlichen Ablenkungselektrophorese auf Filterkarton bei gleichzeitiger Anwendung hoher Feldstärken. Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 311, 63 (1958)

27. JACOB, J. J. C.: The elektrophoretic analysis of protein extract from striated rabbits' muscle. Biochem. J. 41, 83 (1947)

28. JACOB, J. J. C.: The elektrophoretic analysis of protein extract from striated rabbits' muscle. Denaturation in acetat buffers. Biochem. J. 42, 71 (1948)

29. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Stuttgart 1964

30. KAR, N. C. und C. M. PEERSON: CPK isoenzymes in human myopathie. Amer. J. Clin. Path. 43, 3 (1965)

31. KAR, N.C. und C.M. PEERSON: GOT isoenzymes in human myopathie. Proc. Soc. exp. biol. and med. 116, 733 (1964)

32. KARMEN, A., F. WROBLEWSKI und J. LaDUE: Transaminase activity in human blood. Appendix von KARMEN, A.: A note on the spectrophotometric assay of GOT in human blood. J. clin. investig. 34, 126 (1955)

33. KLEINE, T.O.: Zur Lokalisation der Kreatin-Kinase in Mitochondrien und Mikrosomen von Skelettmuskel, Herz und Hiernrinde des Menschen. Klin. Wschr. 43, 504 (1965)

34. KUBY, S.A., L. NODA und H.A. LARDY: Adenosin-triphosphat-creatine-transphosphorylase. J. Biol. Chem. 210, 65 (1954)

35. KUBERTUR, H. et A. DISTECHE: Mesure de l'activité de l'ATP creatine phosphokinase de muscles de grenouille, de tortue et de lapin par enregistrement rapide des échanges d'ions H^+. Arch. intern. physiol. biochem. 70 (2), 246 (1961)

36. LaDUE, J.S., F. WROBLEWSKI und A. KARMEN: Serum GOT activity in human transmural myocardial infarction. Sciences 120 (1954)

37. LAYNE, E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins in: S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN, Methods in enzymology. Vol. III, 447, N.Y. Academic Press Inc. Publishers 1957

38. LAURENT, R., J.C. DREYFUS, G. SCHAPIRA: Elektrophorese des proteines musculaires extractibles en milieu de faible force ionique. Influence de la section nerveuse. Bull. Soc. chem. biol. Paris 43, 432 (1961)

39. LEIDL, L.: Über präparative Elektrophorese löslicher Herzmuskelproteine. Diss. München in Vorbereitung

40. MARKERT, C.O. und F. MCLLER: Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. Proc. nat. acad. science 45, 753 (1959)

41. MOMMAERTS, W.: Arkiv Kemi Min. Geol. 19 An. 2 18, 1 (1945)

42. NOWY, H. und W. SEITZ: Elektrophoretische Untersuchungen des fixierten Kaninchenherzen. Zschr. ges. exp. Med. 126, 1 (1955)

43. NOWY, H.: Elektrophoretische Analysen von Herzmuskelproteinen. Mat. Med. Nordmark XVII, 12, 509 (1965)

44. REITMAN, S. und S. FRANKEL: A colorimetric method for the determination of Serum GOT and GPT. Am J. clin. path. 28, I 56 (1957)

45. RICHTERICH, R., P. SCHLAFROTH, J. P. COLOMBO und F. TEMPERLI: Die Wahl von Enzym-Einheiten bei diagnostischen Untersuchungen. Klin. Wschr. 39, 987 (1961)

46. ROTH, Diss. München in Vorbereitung

47. ROMEL, E. C. und S. J. LaMANCUSA: Elektrophoresis of GOT in serum, beefheart and liver homogenates on cellulose acetate. Clin. chemistry 11, 2, 131 (1955)

48. SCHREIFFARTH, F. et al.: Immunoelektrophoretische Studien zur Frage der Identität menschlicher Organ- u. Serumproteine. Clin. Chim. Acta 6, 481 (1961)

49. SJÖVALL, K.: Creatine-phospho-transferase isozymes. Nature, vol. 202, Nr. 4933, 701 (1964)

50. STEIN, P. und W. LAMPRECHT: Verbesserte Methode zur Messung der Kreatinphosphokinase in Gewebsextrakten und Serum. Klin. Wschr. 40, 4, 177 (1962)

51. SZENT-GYORGYI, A.: Chemistry of muscular contraction. N.Y., Academic Press Inc. Publishers 1951

52. TANZER, M.L. und CH.HILVARG: Creatine Kinase measurement. J.biol. chim. 234, 12, 3201 (1959)

53. WARBURG, O. und W.CHRISTIAN: Protein estimation. Biochem. Zschr. 310, 384 (1941)

54. WEBER, H.H.: Biochem. Zschr. 158, 443 (1925)

55. WEBER, H.H.: Biochem. Zschr. 189, 381 (1927)

56. WEBER, H.H.: Biochem. Biophys. Acta 4, 12 (1950)

57. WIEME, R.J.: Nomenclature of so called insoenzymes. Lancet 1, 270 (1962)

58. WIELAND, TH. und G.PFLEIDERER: Nachweis der Heterogenität von Milchsäuredehydrogenasen verschiedenen Ursprungs durch Trägerelektrophorese. Biochem. Zschr. 329, 112 (1957)

59. WIELAND, TH. et al.: Analytischer Beweis der Hybridnatur von Isozymen der Lactatdehydrogenase. Biochem. Zschr. 340, 483 (1965)

60. WUNDERLY, C.: Die Papierelektrophorese. Frankfurt/M. 1954

Lebenslauf

Am 3. 2. 1941 wurde ich, Tatiana S. Erdely, als Tochter russischer Eltern, Sergej Erdely und Irene Erdely-Krasnopolska, in Kischinew, UdSSR geboren.

Meine Schulausbildung schloß ich mit dem Baccalaureat am Lycée français in New York im Juni 1960 ab.

Im November 1960 immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg / Lahn.

Seit dem Frühjahr 1962 studiere ich in München an der Ludwig-Maximilians-Universität, wo ich im Sommer 1967 die ärztliche Prüfung abgelegt habe.